Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 303-315

Effect of Coconut Milk in Extender on Ram Sperm Quality Post Freezing and Thawing Process

Sara Rahmati[1], Seyyed Mojtaba Mousavi[2*], Ali Forouharmehr[2]

1 and 2- M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran, respectively.
*Corresponding Author's Email: Mousavi.sym@lu.ac.ir

Received: 26-05-2023 Revised: 06-04-2024 Accepted: 26-05-2024 Available Online: 04-08-2024	**How to cite this article:** Rahmati, S., Mousavi, S. M., & Forouharmehr , A. (2024). Effect of coconut milk in extender on ram sperm quality post freezing and thawing process. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 303-315. (In Persian with English Abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.82570.1146

Introduction[1]: Sperm cryopreservation is a highly effective technique utilized in reproductive procedures, particularly in artificial insemination, as it enables the transfer of superior genes to the subsequent generation of animals. However, the exposure of sperm cells to low temperatures during the freezing process can have detrimental effects on their integrity, morphology, and viability (Gangwar et al., 2020). To counteract these negative impacts, cryoprotectants are added to the sperm extender. The primary purpose of incorporating cryoprotectants is to fulfill the energy requirements of the sperm, shield them from the adverse consequences of temperature fluctuations, mitigate the physical and chemical stresses associated with cooling, freezing, and thawing, and create an environment conducive to enhancing sperm survival (Barbas and Mascarenhas, 2009). In recent years, plant-based extenders have emerged as a viable alternative to animal-based extenders for semen preservation in various species. Coconut milk, in particular, has garnered attention due to its rich composition of fatty acids (including polyunsaturated fatty acids), amino acids, sugars, antioxidants, vitamins, and minerals. These components not only provide essential nutrients for maintaining cell function but also serve as a suitable medium for sperm extension and culture (dos Reis *et al.*, 2023; Vasconcelos *et al.*, 2009; Yong *et al.*, 2009). Consequently, this research aims to explore the impact of coconut milk on the quality of ram sperm following cryopreservation.

Materials and Methods: Twice a week, semen samples were obtained from five Lori-Bakhtiari rams using an artificial vagina. The collected semen from these five rams was then combined and divided into six different treatments. These treatments consisted of five variations with varying levels of coconut milk (5%, 10%, 15%, 20%, and 25%) and one treatment with egg yolk (15%). Various parameters such as sperm velocity, membrane integrity and activity, morphology, lipid peroxidation rate, and sperm DNA fragmentation were assessed both before and after the process of cryopreservation. The obtained data was subsequently analyzed using the SAS statistical software.

Results and Discussion: Prior to cryopreservation, the results indicated that, with the exception of the BCF parameter, there were no disparities in the various aspects of sperm kinetics, viability, functionality, and morphology. However, a notable decline in sperm motility parameters was observed after thawing across all treatments. This detrimental impact following the freezing process was more pronounced ($P<0.05$) when using the extender containing coconut milk compared to the extender containing egg yolk. Consequently, in terms of other motility parameters, the egg yolk treatment exhibited significantly higher values ($P<0.05$) than the other treatments, except for VCL (94.36±10.41%) and BCF (5.83±0.70 Hz). The findings of Wojtusik et al. (2018) were consistent with the results obtained in this study. It was observed that using coconut water and coconut milk as substitutes for egg yolk in rhinoceros sperm extenders led to a decrease in both sperm motility and viability. Similarly, the use of powdered coconut water as an extender for cryopreservation of cat sperm resulted in a significant reduction in sperm movement quality compared to a tris extender (de Sousa Barbosa *et al.* 2020).

http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.82570.1146

Furthermore, when comparing different alternatives to egg yolk in the extender of rhinoceros sperm, such as soy lecithin (1 and 2%), coconut water (20%), and coconut milk (20%), it was found that the extenders containing coconut milk or water led to a loss of sperm mobility and viability. However, the extenders containing soy lecithin showed more promise as substitutes for egg yolk, as they maintained sperm viability, morphology, and acrosome integrity better than coconut milk and water (Wojtusik *et al.*, 2018). In contrast to the findings of this investigation, the utilization of extenders comprising powdered coconut water for the cryopreservation of sperm in various animal species, including dogs, boars, horses, goats, and fish, resulted in well-preserved sperm morphological and motility parameters following the freeze-thaw process. Furthermore, studies have demonstrated that freezing goat sperm with coconut milk, bull sperm with coconut oil, and equine and boar sperm with coconut water led to enhanced sperm viability and quality compared to control groups. The ineffectiveness of the extender may be attributed to the presence of salts and ions, such as calcium, potassium, and sodium, in coconut water, which could potentially interact with the channel proteins of the sperm cell plasma membrane. It is important to note that the precise mechanism by which coconut products in the extender maintain sperm characteristics remains unknown. Previous research by Toniolli *et al.* (1996) suggested that coconut water may serve as a protective agent for sperm due to its content of 3-indoleacetic acid. Furthermore, the replacement of glycerol with dimethylformamide in the boar sperm extender resulted in better preservation of sperm quality after the freezing and thawing process compared to other treatments (Silva *et al.* 2015). This suggests that each ingredient present in an extender could have a significant impact on enhancing extender efficiency. It is worth noting that coconut milk contains high levels of polyunsaturated fatty acids, which can make sperm more vulnerable to oxidative stress (dos Reis *et al.*, 2023; Vasconcelos *et al.*, 2009). However, no significant differences were observed in the lipid peroxidation indicator and the DNA fragmentation index among the various extenders used in this study. This could indicate that the extenders had similar antioxidant properties. The variations in the reported findings may be attributed to differences in the combinations and quantities of products used in the extenders, the type of base extender employed, variations in semen combinations and the sensitivity of sperm in different animal species, or discrepancies in the coconut combinations utilized (dos Reis *et al.*, 2023).

Conclusion: This research suggests that substituting egg yolk with coconut milk entirely in a ram sperm extender does not mitigate the negative consequences of cryopreservation. Additional investigations are necessary to determine the specific composition of the extender incorporating coconut-based ingredients for the cryopreservation of ram sperm.

Keywords: Coconut, Extender, Freezing, Ram, Spermatozoa

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۱۵-۳۰۳

تأثیر شیره نارگیل در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

سارا رحمتی[1]، سید مجتبی موسوی[2]*، علی فروهرمهر[2]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۱/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶

چکیده

داشتن یک رقیق‌کننده مناسب که بتواند از اسپرم در برابر آسیب انجماد و یخ‌گشایی محافظت کند، ضروری است. در این راستا، این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر جایگزینی شیره نارگیل با زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ انجام شد. نمونه‌های منی از پنج رأس قوچ لری- بختیاری دو بار در هفته با استفاده از واژن مصنوعی جمع‌آوری شدند. منی ترکیبی از پنج قوچ، تحت شش تیمار شامل سطوح مختلف شیره نارگیل (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) و یک تیمار با زرده تخم‌مرغ (۱۵ درصد) قرار گرفت. قبل و بعد از انجماد، فراسنجه‌های سرعتی اسپرم، یکپارچگی و فعالیت غشاء، مورفولوژی، نرخ پراکسیداسیون لیپیدی و قطعه قطعه شدن DNA اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان، داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شدند. نتایج قبل از انجماد نشان داد که به‌جز فراسنجه BCF، هیچ تفاوتی در سایر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم، زنده‌مانی، فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم و مورفولوژی اسپرم وجود ندارد ($P\geq۰/۰۵$). با این حال، کاهش قابل توجهی در فراسنجه‌های جنبایی اسپرم پس از یخ‌گشایی در همه تیمارها مشاهده شد. این اثر مخرب پس از انجماد در رقیق‌کننده مکمل شده با شیره نارگیل نسبت به رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ بیشتر بود. به‌طوری‌که تیمار زرده تخم‌مرغ به‌جز در VCL (۹۴/۳۶±۱۰/۴۱ μm/s) و BCF (۵/۸۳±۰/۷۰ هرتز)، در سایر فراسنجه‌های جنبایی، به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای مکمل شده با شیره نارگیل بود. مورفولوژی اسپرم، غلظت MDA و نرخ قطعه قطعه شدن DNA نیز تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن شیره نارگیل به رقیق‌کننده اسپرم، جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ برای انجماد اسپرم قوچ نیست.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، انجماد، رقیق‌کننده، قوچ، نارگیل

مقدمه

تلقیح مصنوعی به‌منظور کنترل بیماری، ورود و صدور اسپرم منجمد، قابلیت دسترسی به سوابق دقیق تولیدمثلی و حذف دام‌های نر خطرناک در مزارع، به‌خوبی به‌کار رفته است (Overton, 2005). همچنین، پایه‌ای برای طرح‌های بزرگ تولیدمثلی از قبیل: برنامه‌های هم‌زمان‌سازی فحلی، انتقال رویان، تولید آزمایشگاهی رویان، استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده، شبیه‌سازی و انتقال ژن‌ها است. تلقیح مصنوعی در گوسفند به چند طریق انجام می‌شود که شامل تلقیح به روش‌های واژینال، ترانس‌سرویکال، لاپاراسکوپی و تلقیح درون رحمی بدون نیاز به انجام جراحی است. از میان روش‌های نام برده، تلقیح مصنوعی با روش لاپاراسکوپی، بالاترین درصد باروری و درصد بره‌زایی را ایجاد می‌کند (Fair *et al.*, 2005). از طرفی، نوع اسپرم استفاده‌شده بر بازده روش‌های تلقیح مصنوعی مؤثر است. از اسپرم های مورد استفاده در تلقیح مصنوعی شامل اسپرم منجمد، اسپرم تازه رقیق شده و اسپرم تازه بدون مواد افزودنی است. هرکدام بر درصد باروری تأثیرگذار می‌باشند و کارایی هر یک از روش‌های تلقیح مصنوعی نیز با توجه به نوع اسپرم مورد استفاده، متغیر است (Ehling *et al.*, 2003).

از مزایای استفاده از اسپرم منجمد، ذخیره بلندمدت اسپرم، امکان انتقال آن به نقاط مختلف و تسهیل انتقال ژن‌های برتر به نسل بعدی حیوانات است (Barbas and Mascarenhas, 2009). عیب عمده آن، از بین رفتن غشای پلاسمایی و کاهش باروری اسپرم هنگام انجماد و یخ‌گشایی است، زیرا اسپرم گوسفند نسبت به اسپرم گاو به انجماد و یخ‌گشایی حساس‌تر است و هنگام یخ‌گشایی، درصد اسپرم زنده و درصد اسپرم با حرکت پیش‌رونده کاهش می‌یابد. به همین دلیل، هنگام عبور از گردن رحم، مقدار کمتری از اسپرم به محل لقاح می‌رسد. در نتیجه، باروری پایین، از مشکلات کار با اسپرم منجمد

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: Mousavi.sym@lu.ac.ir)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.82570.1146

است (Anel *et al.*, 2005). قرار گرفتن سلول‌های اسپرم در معرض دمای پایین که برای فرآیند انجماد اسپرم ضروری است، می‌تواند بر یکپارچگی و مورفولوژی اسپرم‌ها تأثیر بگذارد و موجب کاهش زنده مانی آن‌ها شود (Gangwar *et al.*, 2020). بنابراین، داشتن محیط انجماد (رقیق‌کننده) مناسب برای تأمین انرژی مورد نیاز اسپرم، کاهش تنش‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد شدن، انجماد- یخ‌گشایی و ایجاد محیطی مناسب که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌های انجماد- یخ‌گشایی محافظت کند و زنده‌مانی و جنبایی اسپرم را بعد از انجماد- یخ‌گشایی حفظ کند، ضروری است (Barbas (Aisen *et al.*, 2002;and Mascarenhas, 2009.

امروزه تلاش‌های زیادی برای بهبود فرآیندهای انجماد- یخ-گشایی در اسپرم حیوانات مختلف در حال انجام است. استفاده از رقیق‌کننده‌های گیاهی به‌جای حیوانی در دهه اخیر گسترش زیادی پیدا کرده است، به‌طوری‌که می‌توان گفت برای محافظت منی اکثر گونه‌ها مانند انسان، گاو، گوسفند، بز، خوک، سگ، گربه و اسب از رقیق‌کننده‌های گیاهی استفاده شده است.

آب نارگیل، آندوسپرم مایع نارگیل‌های سبز، شیره نارگیل و عصاره مغز میوه نارگیل‌های بالغ حاوی اسیدهای چرب زیادی ازجمله: اسیدهای چرب با چند پیوند غیراشباع (PUFAs)، اسیدهای آمینه، آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، نمک‌ها، پروتئین‌ها، قندها و الکترولیت‌های مختلف هستند، که مواد مغذی لازم برای حفظ سلول ها را فراهم می‌کنند و همچنین به‌عنوان رقیق‌کننده مایع منی و محیط کشت استفاده می‌شوند (Cordeiro *et al.*, 2018; Yong *et al.*, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2009). مطالعات نشان داده‌اند که رقیق‌کننده مبتنی بر شیره نارگیل می‌تواند یک جایگزین مناسب برای نگهداری اسپرم باشد (Salgueiro *et al.*, 2002). برخی مطالعات که بر روی پودر شیره نارگیل انجام‌شده است، نشان داده‌اند که شیره نارگیل، جایگزین مناسبی به‌عنوان محافظت کننده اسپرم بز (Oliveira *et al.*, 2011)، خوک (Bottini-Luzardo *et al.*, 2012)، سگ (Cardoso *et al.*, 2018) و اسب (Sampaio Neto *et al.*, 2002) است.

تحقیقات زیادی در رابطه با اثر شیره نارگیل بر اسپرم حیوانات مختلف صورت گرفته است، امّا بر اساس دانش ما، تاکنون تحقیقی در مورد اثر آن بر انجماد اسپرم قوچ صورت نگرفته است، بنابراین با توجه به مقالات مطالعه شده در مورد شیره نارگیل به نظر می‌رسد که استفاده از آن در رقیق‌کننده اسپرم قوچ بتواند اثرات مفیدی بر زنده-مانی، جنبایی، جنبایی پیش‌رونده و سایر ویژگی‌های اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی داشته باشد. هدف از مطالعه حاضر، تعیین اثر سطوح مختلف شیره نارگیل در رقیق‌کننده اسپرم قوچ نژاد لری- بختیاری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و جمع‌آوری نمونه منی

از تعداد پنج رأس قوچ بالغ نژاد لری (سه تا پنج ساله) با استفاده از واژن مصنوعی، دو بار در هفته اسپرم‌گیری شد. نمونه‌های منی در درون لوله‌های مدرج ریخته شده و با کمک فلاسک حاوی آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده کشاورزی منتقل شدند.

نمونه‌ها بلافاصله در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. انزال‌هایی که معیارها و شرایط ذیل را داشتند، برای انجام آزمایش انتخاب شدند: حجم ۲- ۰/۵ میلی‌لیتر؛ غلظت بیشتر از $10^9 \times$ ۳ اسپرم در هر میلی‌لیتر؛ جنبایی بالای ۸۰ درصد و کمتر از ۱۰ درصد اسپرم ناهنجار. بلافاصله بعد از جمع‌آوری و ارزیابی اولیه نمونه‌ها، به‌منظور جلوگیری از اثرات و پراکنش فردی قوچ‌ها، انزال‌های منتخب، با هم مخلوط شده و برای ادامه آزمایش استفاده شدند.

شش رقیق‌کننده با اضافه کردن سطوح مختلف شیره نارگیل (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد (حجم/حجم) و زرده تخم‌مرغ (۱۵ درصد (حجم/حجم)) به رقیق‌کننده پایه، آماده شد. رقیق‌کننده پایه بر پایه تریس حاوی ۲/۷ گرم تریس، ۱/۰ گرم فروکتوز، ۱/۴ گرم اسید سیتریک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، با PH= ۷/۲ و اسمولاریته ۳۲۰ میلی اسمول بود (Forouzanfar *et al.*, 2010).

نمونه‌های حاوی منی رقیق شده به‌تدریج تا پنج درجه سانتی‌گراد برای مدت سه ساعت سرد و سپس به داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند. پایوت‌ها بلافاصله در فاصله پنج سانتی‌متری بخار نیتروژن مایع به‌مدت ۱۲ دقیقه قرار داده شدند، سپس به داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور و تا زمان یخ‌گشایی ذخیره شدند. بعد از ذخیره‌سازی، پایوت‌ها در حمام آب گرم (۳۷ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه) یخ‌گشایی شدند. برای هر ارزیابی، سه پایوت یخ‌گشایی و بلافاصله در یک لوله آزمایش مخلوط شدند.

ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم

جنبایی اسپرم

برای ارزیابی فراسنجه‌های جنبایی اسپرم، از تیمارهای مختلف، با استفاده از سمپلر، سه قطره پنج میکرولیتری از هر نمونه روی لام ریخته شده و روی هرکدام یک لامل تمیز قرار گرفت. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ منتقل شده و با استفاده از سامانه آنالیز کامپیوتری، جنبایی اسپرم ارزیابی شد. فراسنجه‌هایی که توسط این نرم‌افزار آنالیز شدند شامل: جنبایی کل (TM، درصد)، جنبایی پیش‌رونده (PM، درصد)، میانگین سرعت در مسیر (VAP، میکرومتر در ثانیه)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL، میکرومتر در ثانیه)، سرعت

در مسیر منحنی (VCL، میکرومتر در ثانیه)، جنبایی عرضی سر (ALH، میکرومتر)، درصد خطی بودن جنبایی (LIN، درصد)، تناوب عرضی ضربان سر (BCF، هرتز) و مستقیم بودن مسیر طی شده (STR، درصد) بودند.

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (زنده‌مانی اسپرم)

برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی از رنگ‌آمیزی ائوزین–نیگروزین استفاده شد (WHO). اساس این روش این گونه است که اسپرم‌های مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی اسپرم های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای آماده‌سازی رنگ ۱/۶۷ گرم ائوزین Y به همراه ۲/۹ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با حرارت ملایم حل شد. سپس، ۱۰ گرم رنگ نیگروزین به محلول قبلی اضافه شده و جوشانده شد. در مرحله پایانی، محلول رنگ تهیه شده در دمای اتاق سرد شده و برای جداسازی ذرات ژله‌ای، با فیلتر ۰/۲ میکرومتر، فیلتر شد. برای ارزیابی نمونه، ۱۰ میکرولیتر اسپرم به‌وسیله سمپلر بر روی یک لام گرم و تمیز قرار داده شد. پس از رنگ‌آمیزی، لام‌ها زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ارزیابی شدند. از هر لام، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد.

ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم به‌وسیله آزمایش تورم هایپو اسموتیک (HOS[1]) بررسی شد (Revell and Mrode, 1994). برای ساخت محیط هاس، ۰/۹ گرم فروکتوز و ۰/۴۹ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. فشار اسمزی روی ۱۰۰ میلی‌اسمول و pH روی ۷/۰۲ تنظیم شد. به‌طور خلاصه، ۳۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم، مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام ریخته و گسترش تهیه شد. لام حاصل، زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ ارزیابی شد. از هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره‌خورده (اسپرم‌های دارای غشای فعال) محاسبه شد.

ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم

برای ارزیابی ریخت‌شناسی، از محلول هانکوک استفاده شد (Schäfer and Holzmann, 2000). برای ارزیابی ناهنجاری‌های اسپرم سه قطره از هر نمونه اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به میکروتیوپ حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک افزوده شد. سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و لامل گذاری شد و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. برای محاسبه درصد کل اسپرم‌های غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفته و شمارش شد.

تعیین میزان آسیب به DNA اسپرم

به‌منظور ارزیابی سلامت کروماتین و DNA اسپرم از کیت SDFA[2] استفاده شد که روش آن به این صورت است که این آزمایش در یک بستر میکروژلی تحت تأثیر یک تیمار اسیدی، کروماتین و DNA اسپرم دناتوره می‌شود. در مرحله بعد با حذف پروتئین‌های کروماتین، رشته‌های DNA تا حد ممکن در اطراف سر اسپرم پخش می‌گردند که طی رنگ‌آمیزی به‌صورت هاله‌ای در اطراف سر اسپرم قابل مشاهده هستند. این در حالی است که شکست DNA اسپرم منجر به عدم گسترش رشته‌های DNA و نیز عدم مشاهده هاله یا هاله‌های خیلی کوچک در اطراف سر اسپرم می‌گردد.

ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای منی

اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است. یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی‌رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. یک میلی‌لیتر (حاصل از یخ‌گشایی چهار پایوت) از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر EDTA، یک میلی‌لیتر BHT و دو میلی‌لیتر TCA، با هم مخلوط شده و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله مخروطی در ۱۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ شدن، یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر TBA در میکرو تیوب آمیخته شد. لوله مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در صفحه گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده سپس جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفتومتر) اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شده، نمودار استاندارد رسم شد و غلظت MDA (نانومول در میلی‌لیتر) با استفاده از معادله منحنی استاندارد محاسبه شد (Esterbauer and Cheeseman, 1990).

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و بعد از تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS، میانگین تیمارها با آزمون LSMeans مقایسه شدند. توزیع نرمال

1- Hypo Osmotic Swelling Test

2- Sperm DNA Fragmentation Assay

بودن داده‌ها با آزمـون کولمـوگروف- اسـمیرنوف و شـاپیرو- ویلـک بررسی شد و در مواردی که داده‌ها دارای توزیع نرمال نبودند از تبدیل ریشه دوم استفاده شد. هر تیمار شش تکرار داشت. برای هر تکرار سه پایوت برای ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم استفاده شد. داده‌ها به‌صـورت انحراف معیار ± میانگین حداقل مربعات بیـان شـدند و اختلافـات در سطح P<۰/۰۵، معنی‌دار در نظر گرفته شدند. مدل آمـاری به‌صـورت معادله ذیل بود:

$$Y_{ik} = \mu + T_i + e_{ik} \quad (۱) \text{ معادله}$$

که در آن،µ: بیانگر میانگین جمعیت برای صفت مـوردنظر، Ti: نشانگر اثر تیمار و eik: اثر عوامل کنترل نشـده یـا خطـای آزمایشـی است.

نتایج و بحث

در این مطالعه، جایگزینی شیره نارگیل با زرده تخم‌مرغ در رقیـق کننده اسپرم قوچ در شرایط سـرد، فراسـنجه‌های جنبـایی، زنـده‌مانی، عملکرد غشایی و ریخت‌شناسی اسپرم را به اندازه رقیق‌کننـده حـاوی زرده تخم‌مرغ حفظ کرد (جدول ۱ و ۲). بـا ایـن حـال، نتـایج پـس از انجماد نشان داد که استفاده از شـیره نارگیـل بـه‌عنوان یـک محـافظ برودتی در رقیق‌کننده‌های اسپرم قوچ، نـه‌تنها فراسـنجه‌های جنبـایی اسپرم را بهبود نمی‌بخشد، بلکه به‌طور قابـل تـوجهی کیفیـت اسـپرم منجمد را در رقیق‌کننده‌های مبتنی بر شیره نارگیل کـاهش مـی‌دهـد (جدول ۳).

جدول ۱- مقایسه فراسنجه‌های جنبایی و سرعتی اسپرم قوچ قبل از انجماد

Table 1- Comparison of sperm motility parameters before cryopreservation

فراسنجه[1] Parameter[1]	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵٪ زرده Yolk
درصد جنبایی پیش‌رونده PM (%)	46.12±6.89	48.91±6.89	60.04±7.71	54.28±7.71	44.01±6.89	57.29±6.89
درصد جنبایی کل TM (%)	72.83±9.01	74.08±8.98	81.46±9.90	77.84±9.97	67.70±9.12	78.79±8.90
درصد خطی بودن جنبایی Lin (%)	49.04±10.13	47.35±8.27	48.65±10.13	49.78±8.27	41.27±8.27	52.27±8.27
سرعت در مسیر مستقیم VSL (µm/s)	95.58±24.29	99.17±19.83	117.13±24.29	104.89±19.83	89.84±19.83	92.19±19.83
راستی مسیر طی شده STR (%)	78.50±14.80	76.73±12.09	86.70±14.80	83.47±10.47	67.94±12.09	89.11±10.47
سرعت در مسیر منحنی VCL (µm/s)	104.02±28.79	103.81±23.51	137.18±28.79	121.01±2.36	104.35±23.51	94.77±20.36
میانگین سرعت در مسیر VAP (µm/s)	97.87±24.75	96.92±20.21	116.71±24.75	106.23±17.50	94.64±20.21	83.02±17.50
جنبایی عرضی سر ALH (µm)	4.36±1.14	4.43±.93	5.58±1.14	5.08±0.81	4.56±0.93	4.59±0.81
تناوب عرضی ضربان سر BCF (Hz)	3.80±0.78 [ab]	3.07±0.64 [b]	3. 34±0.78 [b]	4. 1±0.55 [ab]	3.65±0.64 [ab]	5.66±0.55 [a]

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

[۱] TM: درصد جنبایی کل، PM: درصد جنبایی پیش‌رونده، LIN: درصد خطی بودن جنبایی، VSL: سرعت در مسیر مستقیم، VCL: سرعت در مسیر منحنی، VAP: میانگین سرعت در مسیر، ALH: جنبایی عرضی سر، STR: راستی مسیر طی شده و BCF: تناوب عرضی ضربان سر.

در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

The yolk is egg-yolk, and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

[1]TM: Total motility, PM: Progressive motility, LIN: Linearity, VCL: Curvilinear velocity, VSL: Straight linear velocity, ALH: The amplitude of lateral head displacement, STR: Straightness, VAP: Average path velocity, and BCF: Beat cross frequency.

In every row, the difference between the means with dissimilar letters was significant ($P < 0.05$).

جدول ۲- مقایسه زنده‌مانی، فعالیت غشایی سلول و درصد اسپرم هنجار در تیمارهای مختلف قبل از انجماد
Table 2- Values viability, functionality, and morphology of sperm before cryopreservation

فراسنجه Parameter	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵٪ زرده Yolk
درصد اسپرم زنده Live sperm (%)	93.64±2.19	92.86±2.19	92.14±2.19	89.07±2.19	92.96±2.19	93.86±2.19
درصد اسپرم با غشای فعال Functional sperm (%)	86.39±1.51	82.12±1.51	85.88±1.51	84.94±1.51	83.05±1.51	83.82±1.79
درصد اسپرم هنجار Normal sperm (%)	89.76±1.53	88.93±1.40	87.87±1.53	87.75±1.40	91.69±1.40	89.63±1.40

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

The yolk is egg-yolk, and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

جدول ۳- مقایسه فراسنجه‌های جنبایی و سرعتی اسپرم قوچ در تیمارهای مختلف بعد از انجماد
Table 3- Comparison of motility parameters of sperm post-freezing-thawing process

فراسنجه Parameter	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵٪ زرده Yolk
درصد جنبایی پیش‌رونده PM (%)	9.37±1.72 [b]	9.76±1.55 [b]	7.04±1.60 [b]	9.74±1.66 [b]	10.20±1.55 [b]	21.84±1.72 [a]
درصد جنبایی کل TM (%)	20.21±3.01[b]	21.40±2.71 [b]	16.72±2.80 [b]	20.14±2.90 [b]	22.60±2.71 [b]	36. 19±3.01[a]
درصد خطی بودن جنبایی Lin (%)	6.61±1.22 [b]	6.98±1.13 [b]	4.94±1.22 [b]	6.65±1.27 [b]	7.08±1.10 [b]	14.35±1.32 [a]
سرعت در مسیر مستقیم VSL (μm/s)	47.69±7.60 [b]	50.06±7.08 [b]	36.19±7.60 [b]	48.83±7.91 [b]	56.67±6.85 [b]	80.48±8.26 [a]
راستی مسیر طی شده STR (%)	11.09±1.81 [b]	11.56±1.69 [b]	8.90±1.81 [b]	10.86±1.89 [b]	12.16±1.63 [b]	22.47±1.97 [a]
سرعت در مسیر منحنی VCL (μm/s)	70.57±9.58	76.66±8.92	64.37±9.58	67.89±9.97	85.80±8.63	94.36±10.41
میانگین سرعت در مسیر VAP (μm/s)	49.22±7.23 [b]	52.04±6.73 [b]	39.95±7.23 [b]	48.08±7.52 [b]	57.75±6.51 [ab]	76.57±7.86 [a]
جنبایی عرضی سر ALH (μm)	5.06±0.69 [ab]	5.43±0.65 [ab]	4.62±0.69 [b]	4.67±0.72 [b]	5.96±0.63 [ab]	6.95±0.75 [a]
تناوب عرضی ضربان سر BCF (Hz)	4.52±0.71	4.32±0.58	4.51±0.80	5.06±0.99	5.54±0.69	5.83±0.70

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

[۱] TM: درصد جنبایی کل، PM: درصد جنبایی پیش‌رونده، LIN: درصد خطی بودن جنبایی، VSL: سرعت در مسیر مستقیم، VCL: سرعت در مسیر منحنی، VAP: میانگین سرعت در مسیر، ALH: جنبایی عرضی سر، STR: راستی مسیر طی شده و BCF: تناوب عرضی ضربان سر.

در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار بوده است ($P<0/05$).

The yolk is egg-yolk, and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

[1]TM: Total motility, PM: Progressive motility, LIN: Linearity, VCL: Curvilinear velocity, VSL: Straight linear velocity, ALH: The amplitude of lateral head displacement, STR: Straightness, VAP: Average path velocity, and BCF: Beat cross frequency.

In every row, the difference between the means with dissimilar letters was significant ($P < 0.05$).

در بیشتر گونه‌ها، مواد با منشأ گیاهی به‌عنوان جایگزین در رقیق کننده‌های محافظ اسپرم در برابر شوک سرمایی برای کاهش استفاده از مواد با منشأ حیوانی و جلوگیری از آلودگی احتمالی آن‌ها استفاده شده است. عصاره‌های گیاهی حاوی مواد آنتی‌اکسیدانی مانند

کاروتنوئیدها، پلی فنول‌ها و فلاونوئیدها در چندین مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Del Valle *et al.,* 2013). طی فرآیند انجماد- یخ‌گشایی، شوک سرمایی به‌شدت فسفولیپیدهای و گلیکوپروتئین‌های موجود در سطح غشا را تحت تأثیر قرار می‌دهد و موجب شروع آسیب‌های ساختاری و بیوشیمیایی به اسپرم می‌شود. برای جلوگیری از این آسیب‌ها علاوه‌بر مواد محافظ درون‌سلولی، به مواد محافظ خارج سلولی یا نفوذناپذیر نیز نیاز است. این مواد عمدتاً لیپوپروتئین‌ها و پروتئین‌های موجود در منابعی همچون زرده تخم‌مرغ، شیر و منابع گیاهی مانند لسیتین سویا هستند که با عمل بر روی غشای سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرمایی محافظت می‌کنند (Salamon and Maxwell, 1995).

یکی از مهم‌ترین عواملی که نشان از انجماد موفق اسپرم دارد، جنبایی آن است. در تحقیق حاضر، جایگزینی زرده تخم‌مرغ با شیره نارگیل، نتوانست فراسنجه‌های حرکتی اسپرم را پس از انجماد، در حد رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ، حفظ کند. بنابراین، شیره نارگیل جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده اسپرم قوچ نبود. این یافته‌ها با مشاهدات وجتسکی و همکاران (Wojtusik *et al.,* 2018) مطابقت دارد. جایگزینی لسیتین سویا (یک و دو درصد)، آب نارگیل (۲۰ درصد) و شیره نارگیل (۲۰ درصد) با زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده اسپرم کرگدن موجب از دست دادن بیشتر جنبایی و زنده‌مانی اسپرم‌ها شده است. با این حال، رقیق‌کننده حاوی لسیتین سویا، پتانسیل بیشتری را به‌عنوان جایگزین زرده تخم‌مرغ برای حفظ زنده‌مانی، مورفولوژی و یکپارچگی آکروزوم اسپرم‌ها در مقایسه با شیره نارگیل و آب نارگیل نشان داده است (Wojtusik *et al.,* 2018). علاوه‌براین، انجماد اسپرم گربه با استفاده از رقیق‌کننده پودر آب نارگیل به‌طور قابل توجهی کیفیت حرکت اسپرم را در مقایسه با رقیق‌کننده تریس کاهش داده است (de Sousa Barbosa *et al.,* 2020). نتایج یک تحقیق مروری نشان داد که آب نارگیل تأثیر مثبتی بر جنبایی کل سلول‌های اسپرم طی نگهداری در شرایط سرد دارد، درحالی‌که در اسپرم منجمد شده هیچ اثر معنی‌داری مشاهده نشده است (dos Reis et al., 2023). همچنین، استفاده از رقیق کننده‌های مبتنی بر آب نارگیل برای اسپرم اسب در شرایط سرد، فراسنجه‌های جنبایی اسپرم را بهبود نداده است (Brasileiro *et al.,* 2019).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول مهم است، زیرا تبادلات متابولیکی با محیط اطراف را کنترل می‌کند. همچنین، فعال بودن غشای پلاسمایی در فرآیندهای ظرفیت‌دار شدن، واکنش آکروزومی و نفوذ به اووسیت نیاز است (Jeyendran *et al.,* 1984). در مطالعه حاضر، نمونه‌های اسپرم منجمد شده با تیمارهای حاوی زرده، حداکثر زنده‌مانی (۶۱/۶۰±۲/۷۷ درصد) و عملکرد غشایی (۵۵/۴۲±۴/۰۵ درصد) را نسبت به سایر تیمارها نشان دادند (P≤۰/۰۵). درحالی‌که سایر تیمارها از نظر زنده‌مانی و عملکرد غشایی، تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۴). علاوه‌براین، مورفولوژی اسپرم تحت تأثیر هیچ‌کدام از تیمارها قرار نگرفت (P≥۰/۰۵) (جدول ۴).

جدول ٤- مقایسه یکپارچگی، فعالیت غشایی سلول و درصد اسپرم هنجار در تیمارهای مختلف بعد از انجماد

Table 4- Values viability, functionality, and morphology of frozen-thawed sperm

فراسنجه Parameter	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵٪ زرده Yolk
درصد اسپرم زنده Live sperm (%)	37.63±2.97 [b]	41.11±2.77 [b]	45.21±2.77 [b]	41.21±2.77 [b]	39.57±2.77 [b]	61.60±2.77 [a]
درصد اسپرم با غشای فعال Functional sperm (%)	25.57±2.81 [b]	28.27±2.55 [b]	30.38±2.60 [b]	29.10±2.57 [b]	30.49±2.61 [b]	55.42±4.05 [a]
درصد اسپرم هنجار Normal sperm (%)	82.87±2.73	76.56±2.75	79.64±2.58	78.84±2.58	80.42±2.58	82.89±2.73

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

The yolk is egg-yolk and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

In every row, the difference between the means with dissimilar letters was significant (P < 0.05).

غلظت‌های بهینه اسیدهای آمینه، جنبایی و یکپارچگی غشای اسپرم را بهبود می‌بخشد. از سوی دیگر، زمانی که غلظت این عوامل کمتر یا بالاتر از حد ایده‌آل باشد، کاهش قابل توجهی در همین فراسنجه‌ها وجود دارد (Li *et al.,* 2003). اگرچه غلظت اسیدهای

آمینه در این کار تعیین نشده است، چنین عاملی می‌تواند مستقیماً با کاهش یافت شده برای این متغیر مرتبط باشد، زیرا فراوانی آن‌ها در شیره نارگیل قبلاً گزارش شده است (Yong *et al.*, 2009). همچنین، ناتوانی رقیق‌کننده ممکن است مربوط به نمک‌ها و یون‌ها (به‌ویژه کلسیم، پتاسیم و سدیم) در آب نارگیل باشد که ممکن است با پروتئین‌های کانال غشای پلاسمایی سلول‌های اسپرم برهم‌کنش داشته باشند. کاهش زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده‌های مبتنی بر آب نارگیل ممکن است به‌دلیل حلالیت کم و در دسترس بودن کم لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین باشد (de Sousa Barbosa *et al.*, 2020).

برخلاف نتایج مطالعه حاضر، استفاده از رقیق‌کننده‌های حاوی پودر آب نارگیل در انجماد اسپرم سگ (Cardoso *et al.*, 2018)، خوک (Silva *et al.*, 2015)، اسب (London *et al.*, 2017)، بز (Oliveira *et al.*, 2011)، و ماهی (Viveiros *et al.*, 2010)، فراسنجه‌های ریخت‌شناسی و جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی را به‌خوبی حفظ کرده‌اند. همچنین، انجماد اسپرم بز با شیره نارگیل (Daramola *et al.*, 2016)، اسپرم گاو با روغن نارگیل (Tarig *et al.* 2017b) و اسپرم اسب (London *et al.*, 2017) و خوک (Silva *et al.*, 2011) با آب نارگیل نشان داد که زنده‌مانی و کیفیت اسپرم در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است. اثر مفید آب نارگیل بر کیفیت اسپرم به بخش طبیعی آن نسبت داده شده است که حاوی آنیون‌ها و کاتیون‌های مختلف، قندهای آزاد، سوربیتول و اینوزیتول است (Silva *et al.*, 2015). روغن نارگیل یکی دیگر از محصولات نارگیل است که در فرمولاسیون رقیق‌کننده‌های اسپرم حیوانات استفاده می‌شود. استفاده از هشت درصد روغن نارگیل همراه با ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده مبتنی بر تریس، توانسته است کیفیت اسپرم گاو را طی نگهداری در شرایط سرد و پس از انجماد، بهتر حفظ کند (Tarig *et al.* 2017b). همچنین مکمل کردن روغن نارگیل (دو درصد) همراه با غلظت ۱/۵ درصد لسیتین سویا، تمام ویژگی‌های کیفی اسپرم را پس از نگهداری در شرایط سرد بهبود داده است، درحالی‌که پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی، ویژگی‌های کیفی اسپرم را در مقایسه با شاهد بهبود نداده است (Tarig *et al.* 2017a).

همان‌طور که پیش‌تر عنوان شد، فراورده‌های مختلف نارگیل مانند آب نارگیل، پودر آب نارگیل، شیره نارگیل و روغن نارگیل در رقیق‌کننده اسپرم گونه‌های مختلف حیوانی استفاده شده است. اگرچه کاربرد آن‌ها در برخی از گونه‌ها تأثیر مثبتی بر کیفیت اسپرم داشته است، در برخی موارد گنجاندن آن‌ها در رقیق‌کننده‌ها، تأثیر معنی‌داری بر کیفیت اسپرم منجمد شده، نداشته است. الگوی حرکتی اسپرم، به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محیطی که در آن قرار دارد، بسیار حساس است. از طرفی، سازوکار دقیق اثر فراورده‌های نارگیل در رقیق‌کننده برای حفظ ویژگی‌های اسپرم، مشخص نیست. تونیولی و همکاران (Toniolli *et al.*, 1996) نشان دادند که آب نارگیل ممکن است به‌عنوان محافظ اسپرم عمل کند، زیرا آب نارگیل حاوی ۳- ایندول استیک اسید است. علاوه‌براین، جایگزینی گلیسرول با دی متیل فرمامید در رقیق‌کننده اسپرم خوک، کیفیت اسپرم را به دنبال فرآیند انجماد و یخ‌گشایی بهتر از سایر تیمارها حفظ کرد (Silva *et al.*, 2015) این نشان می‌دهد که وجود هر عنصر در یک رقیق‌کننده می‌تواند نقش مهمی در افزایش کارایی آن داشته باشد. به‌عنوان مثال، انجماد اسپرم بز در رقیق‌کننده‌های شیره نارگیل حاوی پیریدوکسین (هشت میلی‌مول)، افزایش قابل توجهی در زنده‌مانی اسپرم، کاهش در درصد اسپرم غیرطبیعی و کاهش غلظت مالون دی‌آلدئید را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داده است (Daramola *et al.*, 2016). علاوه‌براین، انجماد اسپرم اسب در رقیق‌کننده‌های حاوی آب نارگیل، فراسنجه‌های جنبایی اسپرم را بهتر از رقیق‌کننده‌های مبتنی بر زرده تخم‌مرغ حفظ کرده است. همچنین، نرخ آبستنی با اسپرم منجمد در آب نارگیل به‌طور قابل توجهی بیشتر از گروه شاهد بوده است (London *et al.*, 2017).

سامانه محدود محافظت آنتی‌اکسیدانی ذاتی منی، پس از رقیق‌سازی و سردسازی، تضعیف می‌شود (Bilodeau *et al.*, 2000). اسپرم‌ها، به‌ویژه اسپرم قوچ، به‌دلیل محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشای پلاسما، در برابر تنش اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر هستند (Allai *et al.*, 2016) و عدم تعادل بین تولید و حذف گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) منجر به ضعف فراسنجه‌های حرکتی اسپرم می‌شود (Kasimanickam *et al.*, 2007). همچنین تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد باعث عملکرد معیوب اسپرم مانند تخریب یکپارچگی DNA اسپرم (Aitken *et al.*, 2010)، پتانسیل غشای میتوکندری، واکنش آکروزوم و توانایی ضعیف در نفوذ به تخمک می‌شود (Zabludovsky *et al.*, 1999). آسیب DNA اسپرم، بر کیفیت رویان و در نتیجه، بر نرخ آبستنی تأثیر منفی می‌گذارد (Evenson, 2016).

شیره نارگیل حاوی سطوح بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه است که اسپرم را در برابر تنش اکسیداتیو مستعدتر می‌کند. با این حال، در مطالعه حاضر، رقیق‌کننده‌های مختلف از نظر شاخص پراکسیداسیون لیپید و شاخص قطعه قطعه شدن DNA اسپرم، تفاوت قابل توجهی با هم نداشتند (جدول ۵). این ممکن است نشان‌دهنده وضعیت آنتی‌اکسیدانی یکسان در رقیق‌کننده‌های مورد استفاده در این مطالعه باشد. علاوه‌براین، شیره نارگیل حاوی ویتامین C است که به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند (Memon *et al.*, 2012) و گزارش شده است که اثر وابسته به دوز در برابر

تنش اکسیداتیو بر روی اسپرم انسان دارد (Ahmad *et al.*, 2017). بااین‌حال، نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که غلظت این عامل در رقیق‌کننده برای اعمال چنین محافظتی، کافی نبوده است.

جدول ۵- مقایسه میزان پراکسیداسیون لیپید و وضعیت DNA در تیمارهای مختلف بعد از انجماد

Table 5- Lipid peroxidation and DNA fragmentation index (% DFI) in frozen-thawed sperm

فراسنجه Parameter	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵ ٪ زرده Yolk
مالون دی‌آلدئید (نانومول در میلی‌لیتر) MDA (nMol/ml)	2.04±0.42	2.94±0.42	2.03±0.42	1.93±0.42	2.10±0.42	2.79±0.42
شاخص قطعه قطعه شدن DNA (درصد) DFI (%)	10.29±1.90	5.70±1.90	9.12±1.90	10.21±1.90	6.15±2.67	5.06±2.67

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

The yolk is egg-yolk and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

In every row, the difference between the means with dissimilar letters was significant ($P < 0.05$).

شیره نارگیل حاوی کربوهیدرات به‌عنوان منبع قند است (Okolie *et al.*, 2011) که پتانسیل اسمزی سلول‌ها را افزایش می‌دهد و از غشای سلول در برابر آسیب ناشی از سرما محافظت می‌کند (Purdy, 2006). همچنین حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) است که به سیالیت و انعطاف‌پذیری غشا کمک می‌کند (Wassall and Stillwell, 2009). علاوه‌براین، اسیدهای آمینه ضروری موجود در شیره نارگیل نقش مهمی در یکپارچگی غشای سلول دارند (Yong *et al.*, 2009). به هر حال، ترکیب غشای اسپرم در گونه‌های مختلف متفاوت است که تا حدی، تحمل اسپرم به سرما را دیکته می‌کند و ممکن است بر پاسخ سلول به رقیق‌کننده‌ها تأثیر بگذارد (Layek *et al.*, 2016). بنابراین، این تفاوت‌ها در نتایج گزارش شده ممکن است به‌دلیل تفاوت در ترکیبات فرآورده و مقادیر استفاده شده در رقیق‌کننده‌ها، نوع رقیق‌کننده پایه، تفاوت در ترکیبات منی گونه‌های حیوانی و حساسیت اسپرم آن‌ها، یا تفاوت در ترکیب نارگیل استفاده شده، باشد (dos Reis et al., 2023).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که جایگزینی کامل زرده تخم‌مرغ با شیره نارگیل در رقیق‌کننده اسپرم قوچ در شرایط سرد، فراسنجه‌های کیفی اسپرم را به اندازه رقیق‌کننده حاوی زرده حفظ می‌کند، درحالی‌که نمی‌تواند از اثرات نامطلوب انجماد بر اسپرم جلوگیری کند. مطالعات بیشتری برای شناسایی ترکیب دقیق رقیق‌کننده‌ای که بر اساس فراورده‌های نارگیل باشد، برای انجماد اسپرم قوچ نیاز است.

References

1. Ahmad, G., Agarwal, A., Esteves, S., Sharma, R., Almasry, M., Al-Gonaim, A., AlHayaza, G., Singh, N., Al Kattan, L., & Sannaa, W. (2017). Ascorbic acid reduces redox potential in human spermatozoa subjected to heat-induced oxidative stress. *Andrologia*, *49*(10), e12773. https://doi.org/10.1111/and.12773.
2. Aisen, E. G., Medina, V. H., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00653-2.
3. Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., Hedges, A., & McLachlan, R. I. (2010). Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*, *25*(10), 2415-2426. https://doi.org/10.1093/humrep/deq214.
4. Allai, L., Druart, X., Öztürk, M., BenMoula, A., Nasser, B., & El Amiri, B. (2016). Protective effects of *Opuntia ficus*-indica extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, *175*, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.09.013.
5. Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., & Paz, P.d. (2005). Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: A field assay. *Theriogenology*, 63(4), 1235-1247. https://doi.org/10.1016/ j.theriogenology.2004.07.001.

6. Barbas, J., & Mascarenhas, R. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*, 10, 49-62.
7. Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *55*(3), 282-288. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795.
8. Bottini-Luzardo, M., Centurión-Castro, F., Alfaro-Gamboa, M., Aké-López, R., & Herrera-Camacho, J. (2012). Effect of addition of coconut water (*Cocos nucifera*) to the freezing media on post-thaw viability of boar sperm. *Tropical Animal Health and Production*, *45(*1), 101-106. https://doi.org/10.1007/s11250-012-0179.
9. Brasileiro, L. S., Segabinazzi, L. G. T. M., Menezes, E., Salgueiro, C. C., Novello, G., da Cunha Scheeren, V. F., & Nunes, J. F. (2019). Coconut water as an extender component for cooled equine sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78, 69-73. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.03.213.
10. Cardoso, R., Silva, A., & Silva, L. (2005). Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproducction*, *2*, 257-262.
11. Cordeiro, M., Silva, E., Miranda, M., Biondi, F., Santos, S., & Ohashi, O. (2006). The use of coconut water solution (*Cocos nucifera*) as a holding medium for immature bovine oocytes for *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction,* 3(3), 376-379.
12. Daramola, J., Adekunle, E., Iyasere, O., Oke, O., Sorongbe, T., Iyanda, O., & Gbadebo, O. (2016). Effects of coconut milk alone or supplementation with pyridoxine in tris-extenders on viability of buck spermatozoa during vitrification. *Small Ruminant Research, 136*, 208-213. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.02.004.
13. de Sousa Barbosa, B., Izzo, R. G., Silva, H. V. R., Nunes, T. G. P., Brito, B. F., da Silva, T. F. P., & da Silva, L. D. M. (2020). Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from domestic cat using powdered coconut water (ACP-117c) and Tris extenders. *Cryobiology*, *92*, 103-108. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol. 2019.11.042.
14. Del Valle, I., Souter, A., Maxwell, W., Muino-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. (2013). Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science*, *138*(3-4), 213-219. https://doi.org/10.1016/ j.anireprosci.2013.02.022.
15. dos Reis, R. A., Torres, R. d. N. S., Ribeiro, I. M., Torres, C. A. A., & de Freitas, B. W. (2023). Coconut water-based extender for seminal preservation in small ruminants: A meta-analysis study. *Small Ruminant Research*, 106915. https://doi.org/10.1016/j. smallrumres.2023.106915.
16. Ehling, C., Wirth, P., Schindler, L., Hadeler, K.-G., Dpke, H.-H., Lemme, E., & Niemann, H. (2003). Laparoscopical intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved, and frozen semen for the production of ovine zygotes. *Theriogenology*, *60*(4), 777-787. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00049-9.
17. Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, *186*, 407-421. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H.
18. Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, *169*, 56-75. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017.
19. Fair, S., Hanrahan, J., O'Meara, C., Duffy, P., Rizos, D., Wade, M., Donovan, A., Boland, M., Lonergan, P., & Evans, A. (2005). Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*, *63*(7), 1995-2005. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology. 2004.09.005.
20. Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., & Nasr-Esfahani, M. (2010). *In vitro* comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, *73*(4), 480-487. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology. 2009.10.005.
21. Gangwar, C., Kharche, S. D., Mishra, A. K., Saraswat, S., Kumar, N., & Sikarwar, A. K. (2020). Effect of diluent sugars on capacitation status and acrosome reaction of spermatozoa in buck semen at refrigerated temperature. *Tropical Animal Health and Production*, *52*, 3409-3415. https://doi.org/10.31186/jspi.id.18.1.20-26.
22. Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., & Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, *70*(1), 219-228.
23. Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Thatcher, C., Nebel, R., & Cassell, B. (2007). Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*, *67*(5), 1004-1012. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.013.
24. Layek, S., Mohanty, T., Kumaresan, A., & Parks, J. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, *172*, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013.
25. Li, Y., Si, W., Zhang, X., Dinnyes, A., & Ji, W. 2003. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) sperm. American Journal of Primatology: *Official Journal of the American Society*

of Primatologists, 59, 159-165. https://doi.org/10.1002/ajp.10073.
26. London, K. T., Christensen, B. W., Scott, C. J., Klooster, K., Kass, P. H., Dujovne, G. A., & Meyers, S. A. (2017). The effects of an oxygen scavenger and coconut water on equine sperm cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science, 58*, 51-57. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.08.014.
27. Memon, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y., Ebrahimi, M., & Nadia, F. (2012). Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. *Animal Reproduction Science*, *136*(1-2), 55-60. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.020.
28. Okolie, P., Obi, C., & Uaboi-Egbenni, P. (2011). Fungal spoilage of coconut (*Cocos nucifera* L.) fruits during storage and the growth differential of isolates on selected amino acids and carbohydrates. *Pakistan Journal of Nutrition*, *10*(10), 965-973. http://pjbs.org/pjnonline/ab2089.htm.
29. Oliveira, R., Nunes, J., Salgueiro, C., Cavalcante, J., Brasil, O., & Moura, A. (2011). Evaluation of goat spermatozoa frozen in media based on powder coconut water media based (ACP-101®) or TRIS. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *63*(6), 1295-1302. https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600003.
30. Overton, M. (2005). Cost comparison of natural service sires and artificial insemination for dairy cattle reproductive management. *Theriogenology*, *64*(3), 589-602. https://doi.org/10.1016/ j.theriogenology. 2005.05.015.
31. Purdy, P. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, *63*(3), 215-225. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015.
32. Revell, S., & Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 77-86. https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90055-8.
33. Salamon, S., & Maxwell, W. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3), 185-249. https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I.
34. Salgueiro, C., Nunes, J., Oliveira, K., Vieira, V., Gondim, J., & Mateos-Rex, E. (2002). Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *1*(5), 96-98.
35. Sampaio Neto, J., Salgueiro, C., Mateos-Rex, E., & Nunes, J. (2002). Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal, 5*, 137-139.
36. Schäfer, S., & Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science, 59*(3), 201-211. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00073-7.
37. Silva, C., Cunha, E., Blume, G., Malaquias, J., Báo, S., & Martins, C. (2015). Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*, 70(2), 90-94. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.01.001.
38. Silva, M., Peixoto, G., Santos, E., Castelo, T., Oliveira, M., & Silva, A. (2011). Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology*, *76*(6), 1084-1089. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.014.
39. Tarig, A., Wahid, H., Rosnina, Y., Yimer, N., Goh, Y., Baiee, F., Khumran, A., Salman, H., Assi, M., & Ebrahimi, M. (2017a). Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen. *Veterinary World*, *10*(6), 672.
40. Tarig, A., Wahid, H., Rosnina, Y., Yimer, N., Goh, Y., Baiee, F., & Ebrahimi, M. (2017b). Effect of different concentrations of egg yolk and virgin coconut oil in tris-based extenders on chilled and frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 182, 21-27. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.024.
41. Toniolli, R., Bussière, J., Courot, M., Magistrini, M., & Combarnous, Y. (1996). Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15 C of boar semen for artificial insemination. *Reproduction Nutrition Development*, *36*(5), 503-511.
42. Vasconcelos, A. B., Santos, A. M. C., Oliveira, J. S., de Albuquerque Lagares, M., & Santoro, M. M. (2009). Purification and partial characterization of proteinase inhibitors of equine seminal plasma. *Reproductive Biology*, *9*(2), 151-160. https://doi.org/10.1016/ S1642-431X(12)60023-0.
43. Viveiros, A., Nascimento, A., Orfão, L., & Isaú, Z. (2010). Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74(4), 551-556. https://doi.org/10.1016/j. theriogenology.2010.03.018.
44. Wassall, S. R., & Stillwell, W. (2009). Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1788*(1), 24-32. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.011.
45. Wojtusik, J., Stoops, M. A., & Roth, T. L. (2018). Comparison of soy lecithin, coconut water, and coconut milk as substitutes for egg-yolk in semen cryodiluent for black rhinoceros (*Diceros bicornis*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *Theriogenology, 121*, 72-77. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology. 2018.07.042.
46. Yong, J. W., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of

coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, *14*(12), 5144-5164. https://doi.org/10.3390/molecules14125144.

47. Zabludovsky, N., Eltes, F., Geva, E., Berkovitz, E., Amit, A., Barak, Y., Har-Even, D., & Bartoov, B. (1999). Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Andrologia*, *31*(2), 91-98. https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.